

PCT/EP200 4 / 0 0 8 3 9 0

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 02 SEP 2004

WIPO PCT

27. 07. 2004



## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 35 253.8

**Anmeldetag:** 1. August 2003

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

**IPC:** C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Juli 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Schäfer

## Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

Gegenstand der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae.

### 5. Stand der Technik

L-Threonin findet in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Threonin durch Fermentation von Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli* und *Serratia marcescens*, hergestellt werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieser Aminosäure wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können

- 15 fermentationsstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen, 20 d.h. die genetisch bedingten Leistungseigenschaften des Bakteriums selbst betreffen.

### Aufgabe der Erfindung

- Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L- 25 Threonin bereitzustellen.

### Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Fermentationsverfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- 30 a) ein L-Threonin produzierendes Bakterium der Familie Enterobacteriaceae in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,

b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben, und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei

- c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der Kultivierung bei maximal 10 g/l eingestellt wird, und
- d) die Ausbeute des gebildeten L-Threonins bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle mindestens 37 Gew.-% beträgt, und
- e) L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.

Erfindungsgemäß kann die Anlagenleistung einer L-Threonin produzierenden Fermentationseinheit dadurch gesteigert werden, dass man in dem oben beschriebenen ersten Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert, wobei bei Verwendung des Zulaufverfahrens mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird. In dem beschriebenen Kultivierungsschritt (b) werden mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zugeführt und gleichzeitig wird der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnommen,

der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen.

Während des Kultivierungsschrittes (a) wird das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und nach  
5 dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert. Bei Verwendung des Zulaufverfahrens wird nach mehr als 0 bis maximal 10 Stunden, vorzugsweise nach 1 bis 10 Stunden, bevorzugt nach 2 bis 10 Stunden und besonders bevorzugt nach 3 bis 7 Stunden ein Zusatz-Nährmedium  
10 zugeführt.

Das erste Nährmedium enthält als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fructose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose,  
15 Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 1 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 45 g/kg, besonders bevorzugt von 20 bis 40 g/kg. Unter Stärkehydrolysat versteht man erfindungsgemäß das Hydrolysat von Stärke aus Mais, Getreide, Kartoffeln oder  
20 Tapioka.

Als Stickstoffquelle im erste Nährmedium können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen  
25 wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat Kaliumnitrat, Kaliumnatriumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 1 bis 40 g/kg, bevorzugt von 10 bis 30  
30 g/kg, besonders bevorzugt von 10 bis 25 g/kg verwendet werden.

Als Phosphorquelle im ersten Nährmedium können Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder

- Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natriumhaltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits auch Phytinsäure genannt in den Konzentrationen von 0,1 bis 5 g/kg, bevorzugt von 0,3 bis 3 g/kg, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 g/kg verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Diese Substanzen liegen in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg vor. Schließlich werden essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.
- 15 Das Zusatz-Nährmedium, welches in einem Zulaufverfahren (fed batch) angewandt wird, enthält im allgemeinen lediglich als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, 20 Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 300 bis 700 g/kg, bevorzugt von 400 bis 650 g/kg, und gegebenenfalls eine anorganische Stickstoffquelle wie z.B. Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, 25 Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Alternativ können diese und andere Komponenten auch separat zugefüttert werden.
- 30 Es wurde gefunden, dass die Bestandteile des weiteren Nährmediums in Form eines einzigen weiteren Nährmediums sowie in einer Vielzahl von weiteren Nährmedien der Kultur zugeführt werden können. Erfindungsgemäß wird das weitere Nährmedium beziehungsweise werden die weiteren Nährmedien in mindestens einem (1) Zufütterungsstrom oder in einer 35 Vielzahl an Zufütterungsströmen mindestens 2 bis 10,

vorzugsweise 2 bis 7 oder 2 bis 5 Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt.

Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien enthält/enthalten als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere  
5 der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 20 bis 700 g/kg, bevorzugt von 50 bis 650 g/kg.

10 Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Stickstoffquelle bestehend aus organischen, Stickstoff-haltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen  
15 wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat und/oder Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 5 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 40  
20 g/kg, verwendet werden.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Phosphorquelle bestehend aus Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder  
25 Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits auch Phytinsäure genannt. Die Phosphorquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 0,3 bis 3 g/kg,  
30 bevorzugt von 0,5 bis 2 g/kg verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind, in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg, bevorzugt in den Konzentrationen von 0,008 bis  
35 2 g/kg. Schließlich werden essentielle Wachsstoffe wie

Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

5 Bei Verwendung eines einzigen weiteren Nährmediums wird dieses typischerweise in einem Zufütterungsstrom der Kultur zugeführt. Bei Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien werden diese in einer entsprechenden Vielzahl an Zufütterungsströmen zugeführt. Bei der Verwendung einer

10 Vielzahl weiterer Nährmedien ist zu beachten, dass diese jeweils nur eine der beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen enthalten können, aber auch eine Mischung von den beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen.

15 Erfindungsgemäß wird das zugeführte Nährmedium oder die zugeführten Nährmedien so eingestellt, das ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal  
20 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 mmol Phosphor / mol Kohlenstoff besteht.

Der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme in dem erfindungsgemäßen Verfahren werden mit einer  
25 Geschwindigkeit entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner als 30 Stunden, bevorzugt kleiner als 25, ganz besonders bevorzugt kleiner als 20 Stunden hinzugeführt. Dabei ist die mittlere Verweilzeit (residence time) die theoretische Zeit, die Teilchen in einer kontinuierlich  
30 betriebenen Kultur verbleiben. Die mittlere Verweilzeit wird beschrieben durch das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens des Reaktors und der Durchflussmenge (Biotechnologie; H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre; Gustav Fischer Verlag Jena; 1991).

Starkes Wachstum zu Beginn der Kultivierung ist normalerweise eine logarithmische Wachstumsphase. Der logarithmischen Wachstumsphase folgt im allgemeinen eine Phase von geringerem Zellwachstum als in der

5 logarithmischen Phase.

Nach 10 bis 72 Stunden, vorzugsweise 15 bis 48 Stunden, bzw. während oder nach der logarithmischen Wachstumsphase wird wie oben beschrieben mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder  
10 mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmestromen entnommen, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen. Im  
15 wesentlichen bedeutet hier, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht. Die Entnahme kann durch Abpumpen und oder durch Ablassen der Kulturbrühe technisch  
20 realisiert werden.

Erfindungsgemäß wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultivierung bei maximal 10 g/l, bevorzugt bei maximal 5 g/l, besonders bevorzugt maximal 2 g/l eingestellt. Dabei wird die Konzentration der  
25 Kohlenstoffquelle anhand von Methoden bestimmt, die Stand der Technik sind.  $\beta$ -D-Glukose wird z.B. in einem Glukoseanalysator YSI 02700 Select der Firma Yello Springs Instruments (Yellow Springs, Ohio, USA) bestimmt.

Gegebenenfalls kann die entnommene Kulturbrühe mit  
30 Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen werden bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; oder unter 0,5 g/l sinkt.

Erfindungsgemäß beträgt die Ausbeute mindestens 37 Gew.-%; mindestens 40 Gew.-%; mindestens 42 Gew.-%; mindestens 44



Gew.-%; mindestens 46 Gew.-%, mindestens 48 Gew.-% betragen. Dabei ist die Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Menge an L-Threonin zu der Gesamtmenge der eingesetzten oder verbrauchten Kohlenstoffquelle.

Erfindungsgemäß wird L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 3,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std., oder von mindestens 5,0 bis 8,0 g/l oder mehr pro Std. gebildet. Dabei ist die Raum-Zeit-Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Threoninmenge zu dem aktiv produzierenden Volumen der Kultur über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gesehen. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird auch volumetrische Produktivität genannt.

Während der Kultivierung wird die Temperatur in einem Bereich von 29 bis 42°C, vorzugsweise von 33 bis 40°C, eingestellt. Die Kultivierung kann bei Normaldruck oder gegebenenfalls bei Überdruck, vorzugsweise bei 0 bis 1,5 bar Überdruck durchgeführt werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf 5 bis 50%, vorzugsweise ca. 20%, Luftsättigung geregelt. Dabei wird die Kultur gerührt und mit Sauerstoff versorgt. Die Regelung des pH-Wertes auf pH ca. 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 kann mit 25%igem Ammoniakwasser erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird 72 Stunden vorzugsweise 100 bis 200 besonders bevorzugt 200 bis  $\geq 300$  Stunden betrieben. Dabei wird das Volumen der Kultur mindestens ein halbes Mal, mindestens 2 Mal, mindestens 4 Mal, mindestens 6 Mal, mindestens 8 Mal, mindestens 10 Mal, mindestens 12 Mal ausgetauscht.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind L-Threonin produzierende Bakterien der Familie

Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia geeignet. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Die Bakterien enthalten mindestens eine Kopie eines thrA-Gens oder Allels, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.

Derartige Bakterien sind typischerweise resistent gegen das Threoninanalogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV).

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthalten. Die amber-Mutation liegt vorzugsweise an der Position 33 entsprechend der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes.

Als amber-Suppressor wird vorzugsweise supE eingesetzt. Diese Bakterien sind in PCT/EP02/02055 beschrieben.

Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens kann dem Stand der Technik entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens entsprechend der Accession No. AE000358 ist als SEQ ID NO. 1 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des dazugehörigen RpoS-Genproduktes bzw. Proteins ist in der SEQ ID NO. 2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz eines rpoS-Allels, das ein Stopkodon vom Typ amber an der Stelle der Nukleotidsequenz entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes bzw. Proteins, entsprechend SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 2, enthält, ist in SEQ ID NO. 3 wiedergegeben. Der Suppressor supE ist ebenfalls im Stand der Technik beschrieben und als SEQ ID NO. 4 dargestellt.

Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (=Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100%) oder nahezu vollständig d.h. mehr als  
5 oder größer als (>) 90%, >95%, >97%, >99% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h. zu 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt größer gleich ( $\geq$ ) 50%,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 90\%$  oder  $\geq 95\%$  oder auch  
10 vollständig (100%) im Produkt belässt.

Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

15 Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt  
20 beziehungsweise konzentriert.

Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver  
25 aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90%  
30 entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als 10%, kleiner als 5% beträgt.

Die angegebenen Verfahrensschritte müssen nicht notwendigerweise in der hier aufgeführten Reihenfolge

durchgeführt sondern können gegebenenfalls in technisch sinnvoller Weise kombiniert werden.

Die Analyse von L-Threonin und anderen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender  
5 Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,
- b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt, wobei das Nährmedium oder die Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei
- c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 10 g/l eingestellt wird, und
- d) die Ausbeute des gebildeten L-Threonins bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle mindestens 37 Gew.-% beträgt, und
- e) L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Zulaufverfahren (fed batch) durchgeführt wird, wobei mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird.
- 5 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 10 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
- 15 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kohlenstoffquelle um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol handelt.
- 20 7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Stickstoffquelle um eine oder mehrere organische, Stickstoff-haltige Stoffe oder Stoffgemische ausgewählt aus der Gruppe Peptone, Hefeextrakte, Fleischextrakte, Malzextrakte, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff und/oder  
25 um eine oder mehrere der anorganischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Ammoniak, Ammonium-haltige Salze und Salze der Salpetersäure handelt.
- 30 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei Ammonium-haltigen Salzen und Salzen der Salpetersäure um Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat und Kaliumnatriumnitrat handelt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Phosphorquelle um Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure oder deren Polymere oder der Phytinsäure handelt.
- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Alkalisalzen der Phosphorsäure um Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze handelt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Bakterien der Familie Enterobacteriaceae um die Art Escherichia coli handelt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae mindestens ein thrA-Gen oder Allel enthält, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt  
30 amber-Suppressor enthält.
15. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme mit einer Geschwindigkeit

entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner 30 Stunden, bevorzugt kleiner 25, ganz besonders bevorzugt kleiner 20 Stunden hinzugeführt wird.

- 5 16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem zugeführtem Nährmedium oder den zugeführten Nährmedien ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 eingestellt wird.
- 10
- 15 17. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen wird bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; unter 0,5 g/l sinkt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 20 19. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
- 25 20. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 g/l eingestellt wird.
- 30 21. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 2 g/l eingestellt wird.



22. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 48 Gew.-% beträgt.
- 5 23. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 44 Gew.-% beträgt.
- 10 24. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 40 Gew.-% beträgt.
- 15 25. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 5,0 bis mehr als 8,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 20 26. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
27. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std. gebildet wird.
- 25 28. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zulaufverfahren im Kultivierungsschritt (a) angewandt wird, und dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie

5 Enterobacteriaceae.

## SEQUENZPROTOKOLL:

5 &lt;110&gt; Degussa AG

&lt;120&gt; Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

10 &lt;130&gt; 030217 BT

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

15

<210> 1  
 <211> 993  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(990)  
 <223>

25

<400> 1  
 atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa 48  
 Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu  
 1 5 10 15

30

ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa 96  
 Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu  
 20 25 30

35

cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag 144  
 Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln  
 35 40 45

gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag 192  
 Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu  
 50 55 60

45

att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gaa gtt tat ttt gcg 240  
 Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala  
 65 70 75 80

cgt cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag 288  
 Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu  
 85 90 95

50

agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt 336  
 Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg  
 100 105 110

55

ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc 384  
 Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile  
 115 120 125

60

cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca 432  
 Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr  
 130 135 140



Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln  
                   35                  40                  45  
 5 Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu  
           50                  55                  60  
 Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala  
   65                  70                  75                  80  
 10 Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu  
                   85                  90                  95  
 Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg  
                   100                  105                  110  
 15 Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile  
           115                  120                  125  
 Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr  
           130                  135                  140  
 Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn  
   145                  150                  155                  160  
 25 Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn  
                   165                  170                  175  
 Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu  
                   180                  185                  190  
 30 Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp  
           195                  200                  205  
 Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr  
   35          210                  215                  220  
 Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp  
   225                  230                  235                  240  
 40 Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys  
                   245                  250                  255  
 Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu  
                   260                  265                  270  
 45 Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu  
           275                  280                  285  
 Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln  
   50          290                  295                  300  
 Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln  
   305                  310                  315                  320  
 55 Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu  
                   325                  330  
 <210> 3  
 <211> 993  
 60 <212> DNA  
       <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> Allel  
 <222> (1)..(990)  
 <223> rpoS-Allel  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (97)..(99)  
 <223> amber-Kodon  
 10  
 <400> 3  
 atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaataag atgcggaatt tgatgagaac 60  
 ggagttgagg tttttgacga aaaggcctta gtagaatagg aaccagtgta taacgatttg 120  
 15 gccgaagagg aactgttatc gcaggagacc acacagcgtg tggtggacgc gactcagctt 180  
 taccttggtg agattgggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttattttgcg 240  
 cgtcgcgcac tgcgtggaga tgctgcctct cgccgccgga tgatcgagag taacttgctt 300  
 ctggtggtaa aaattgcccg ccgttatggc aatcgtggtc tggcgttgct ggaccttatt 360  
 gaagagggca acctggggct gatccgcgcg gtagagaagt ttgacccgga acgtggtttc 420  
 25 cgcttctcaa catacgcaac ctggtggatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac 480  
 caaaccgta ctattcggtt gccgattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga 540  
 30 accgcacgtg agttgtccca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaga gatcgagag 600  
 caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga gcgcattacc 660  
 tcggtagaca ccccgctggg tgggtgattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat 720  
 35 gaaaaagaga acggtccgga agataccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcgtc 780  
 aaatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggtttg 840  
 ctggggtacg aagcggcaac actggaagat gtaggtcgtg aaattggcct caccggtgaa 900  
 cgtgttcgcc agattcaggt tgaaggcctg cgccgtttgc gcgaaatcct gcaaacgcag 960  
 gggctgaata tcgaagcgtt gttccgcgag taa 993  
 45  
 <210> 4  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 50  
 <220>  
 <221> tRNA  
 <222> (1)..(75)  
 <223> supE-Allel  
 55  
 <400> 4  
 tggggtatcg ccaagcggta aggcaccgga ttctaattcc ggcattccga gggtcgaatc 60  
 ctcgtacccc agcca 75  
 60